

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-10171

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和64年(1989)1月13日

G 01 N 30/88
30/02F-7621-2G
B-7621-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑭ 発明の名称 アミノ酸分析方法

⑰ 特 願 昭62-166525

⑱ 出 願 昭62(1987)7月3日

⑲ 発 明 者 村 北 宏 之 東京都調布市柴崎1丁目63-1 株式会社島津製作所東京
分析センター内
⑳ 出 願 人 株式会社島津製作所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地
㉑ 代 理 人 弁理士 西川 慶治 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

アミノ酸分析方法

2. 特許請求の範囲

逆相イオンペアカラムを固定相に、5乃至20ミリモルのリン酸緩衝液にペンタンスルホン酸ナトリウムを3乃至7ミリモル溶解して水素イオン濃度Ph2乃至3に調製したものを移動相に使用することを特徴とするアミノ酸分析方法。

3. 発明の詳細な説明

(技術分野)

本発明は、複数種のアミノ酸を高速液体クロマトグラフィにより分析する方法に関する。

(従来技術)

例えば、3つのアミノ酸が一方のカルボキシル基と他方のアミノ基との間で酸アミド結合した、いわゆるトリペプチドを酵素によりアミノ酸に分解する研究においては、酵素の活性度を調査する目的で、試料中のアミノ酸とジペプチドの比率を測定する必要がある。このような試料において

は、通常複数種の移動相を使用して複数回に亘って分析を行なう必要があり、分析に手間と時間を要するという問題があった。

(目的)

本発明はこのような問題に鑑みてなされたものであって、その目的とするところはアミノ酸とジペプチドを単一の移動相により確実に分離させ、もって分析時間の短縮と簡素化を図ることができ、高速液体クロマトグラフィにより分析する方法を提案することにある。

(発明の概要)

すなわち、本発明が特徴とするところは逆相イオンペアカラムを固定相に、5乃至20ミリモルのリン酸緩衝液にペンタンスルホン酸ナトリウムを3乃至7ミリモル溶解して水素イオン濃度Ph2乃至7に調製したものを移動相に使用し、単一の移動相でトリペプチド分解過程におけるアミノ酸とジペプチドを迅速に分離させるようにした点にある。

(実施例)

そこで以下に本発明の詳細を図示した実施例に基づいて説明する。

第1図は本発明に使用する装置の一例を示すものであって、図中符号1はシリカ粒子の表面にオクタデシル基を化学結合した固定相を充填してなる逆相イオンペアカラムで、これの一端は試料注入口3を介して移動相液槽2に、紫外吸光度検出器4に接続されている。なお、図中符号5は送液ポンプを示す。

このように構成された装置において、移動相液槽2に5 mモルのヘプタンスルホン酸ナトリウムを含む10 mモルのリン酸水溶液を収容する。

このような準備を終えた段階で、酵素分解中のトリペプチド溶液を試料として注入すると、試料中に含まれているジペプチドとアミノ酸はそれぞれ陽電荷を持つことになって、移動相中のヘプタンスルホン酸ナトリウムと選択的にイオンペアを形成し、逆相イオンペアクロマトグラフィーにより保持される。

ン、アラニン-アラニン、アラニン-グルタミン酸がそれぞれ独立したピークとして検出することができた。

一方、比較のためにペンタンスルホン酸ナトリウム、及びヘキサンスルホン酸ナトリウムを使用して分析したところ、アラニン-アラニン、アラニン-グルタミン酸は独立したピークとして検出できたものの、グルタミン酸とアラニンはそれぞれのピークが重なってしまった。

このことから、ジペプチドとアミノ酸を含む試料の分析にはイオンペア試薬としては、ヘプタンスルホン酸ナトリウムが極めて有効であることが解った。

なお、この実施例においては、アミノ酸とアラニンを含む試料に例を採って説明したが、他のアミノ酸からなるトリペプチドの酵素分解溶液についても同様に適用することが可能である。

なお、この実施例においては、紫外吸光度法により検出しているが、オルトフタルアルデヒド誘導体化法を適用した場合には、選択的な検出が可

この結果、グルタミン酸、アラニン、アラニン-アラニン、グルタミン酸-アラニンの順番で分離し、波長200 nmより検出される。

[実施例1]

シリカ粒子にオクタデシル基を化学結合した逆相イオンペアカラムを固定相に、10ミリモルのリン酸緩衝液(水素イオン濃度 $\text{pH} 2.6$)にヘプタンスルホン酸ナトリウムを5 mモル溶解した移動相に使用するとともに、上記固定相を50℃に維持し、また移動相を1.5 ml/分の流量で供給してながら、酵素分解中のジペプチド溶液を試料として分析したところ、グルタミン酸、アラニン、アラニン-アラニン、アラニン-グルタミン酸をそれぞれ独立したピークとして検出することができた(第2図)。

つぎに、上記リン酸緩衝液の濃度を5乃至20 mモル(水素イオン濃度 $\text{pH} 2 \sim 3$)の範囲内で変更するとともに、ヘプタンスルホン酸ナトリウムを3乃至7ミリモルの範囲内で変更して同一の試料を分析したところ、グルタミン酸、アラニ

能となる。

(効果)

以上説明したように本発明によれば、逆相イオンペアカラムを固定相に、5乃至20ミリモルのリン酸緩衝液にヘプタンスルホン酸ナトリウムを3乃至7ミリモル溶解して水素イオン濃度 $\text{pH} 2$ 乃至3に調製したものを移動相に使用したので、試料中に含まれる複数種のアミノ酸を同一移動相により確実に分離して分析することができて、分析時間の短縮と分析作業の簡素化を図ることができる。

4. 図面の簡単な説明

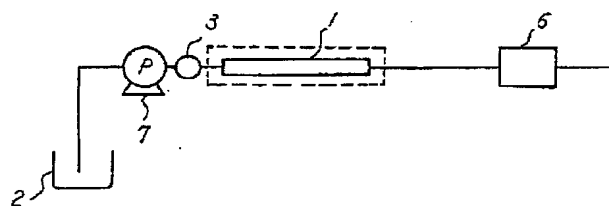
第1図は本発明に使用する装置の一例を示す構成図、第2図は同上装置による分析結果を示すクロマトグラムである。

1...逆相イオンペアカラム 2...移動相液槽
4...紫外吸光度検出器

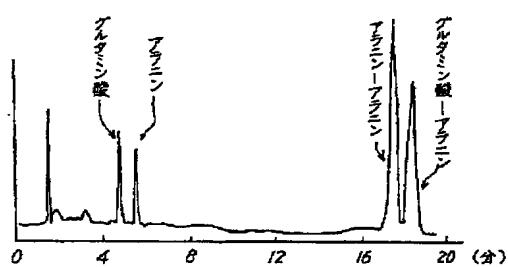
出願人 株式会社 島津製作所

代理人 弁理士 西 川 慶 治
同 木 村 勝 彦

第 1 図



第 2 図



ANALYSIS OF AMINO ACID

Publication number: JP1010171 (A)

Publication date: 1989-01-13

Inventor(s): MURAKITA HIROYUKI

Applicant(s): SHIMADZU CORP

Classification:

- **international:** **G01N30/02; G01N30/88; G01N30/00;** (IPC1-7): G01N30/02; G01N30/88

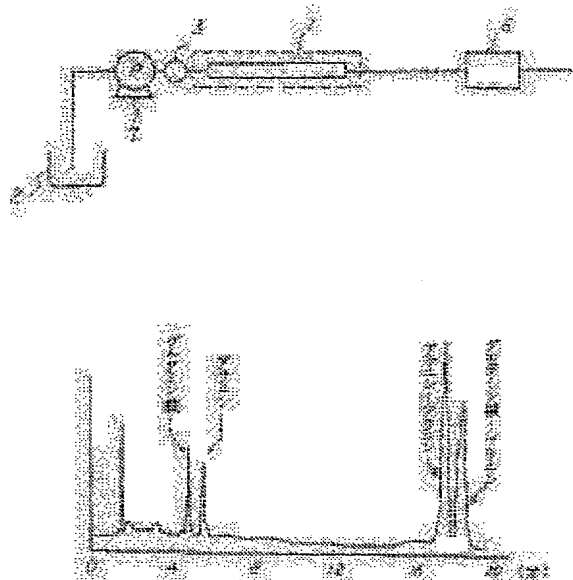
- **European:**

Application number: JP19870166525 19870703

Priority number(s): JP19870166525 19870703

Abstract of JP 1010171 (A)

PURPOSE: To shorten the time for analysis and to simplify an analysis operation by using a reversed phase ion pair column as a stationary phase and a soln. prepd. by dissolving sodium pentanesulfonate into a phosphoric acid buffer soln. as a mobile phase. **CONSTITUTION:** The reversed phase ion pair column 1 is used as the stationary phase and the soln. prepd. by dissolving 3-7mmol. sodium pentanesulfonate into 5-20mmol. phosphoric acid buffer soln. and adjusting the concn. of hydrogen ions to 2-3pH is used as the mobile phase 2. The stationary phase is maintained at 50 deg.C and while the mobile phase 2 is supplied at 1.5ml/min flow rate, a dipeptide soln. under enzyme decomposition is analyzed as a sample. Then, glutamic acid, alanine, alanine-alanine, and alanine-glutamic acid are detected respectively as independent peaks.; The time for the analysis is thereby shortened and the analysis operation is simplified.



Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide